

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許公開番号
特開2000-146911
(P2000-146911A)

(43) 公開日 平成12年5月26日 (2000.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テレポート* (参考)
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 27/26	3 0 1 A
B 0 1 D 57/02		B 0 1 D 57/02	
B 0 3 C 5/00		B 0 3 C 5/00	Z
C 0 7 H 1/08		C 0 7 H 1/08	
21/00		21/00	

審査請求 未請求 請求項の数 6 書面 外国語出願 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-252072	(71) 出願人	594199337 オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、 ロチェスター、インディゴ クリーク ドライブ 100
(22) 出願日	平成11年8月4日 (1999.8.4)	(72) 発明者	キャロル アン クリーダー アメリカ合衆国、ミズーリ 63122、カー クウッド、ガブリエル ドライブ 500
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 9 5 2 5 8	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬 (外4名)
(32) 優先日	平成10年8月4日 (1998.8.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (U.S.)		
(31) 優先権主張番号	0 9 / 3 4 9 3 8 7		
(32) 優先日	平成11年7月9日 (1999.7.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (U.S.)		

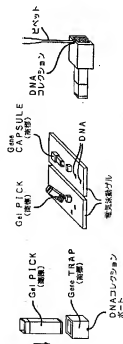
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を分離する方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、核酸をその他の細胞破砕物、特に低い pH において正味の電荷が正である物質から、酸性条件下での電気泳動により分離するための方法に関する。

【解決手段】 本発明の精製法では、試料を電気泳動ゲルにアプライしその試料を酸性条件下で電気泳動させることにより、核酸が同一の生物学的試料中のタンパク質から分離される。至適 pH は、試料の種類によって異なる可能性があるが、当業者であれば容易に求めることができる。当該分離を約 2 ～ 約 4 の pH 範囲で行うことが好ましい。より好ましくは電気泳動を pH = 2.5 で実施する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の細胞破砕物から核酸を分離する方法であって、

- (a) 前記試料をpHの低い酸媒体に適用する工程と、
- (b) 前記試料に電界手段を施す工程と、
- (c) 前記酸媒体中の前記核酸を前記細胞破砕物から分離する工程とを含んでなる方法。

【請求項2】 前記電気泳動を約2〜約4のpHで行う、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記細胞破砕物がタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記電界手段が電気泳動である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記細胞破砕物の正味の電荷が正である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 生物学的試料から核酸を精製する方法であって、

- (a) 前記試料をpHの低い酸媒体に適用する工程と、
- (b) 前記試料に電界手段を施す工程と、
- (c) 前記酸媒体中の前記核酸を前記細胞破砕物から分離する工程とを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、生物学的試料中のタンパク質のような細胞破砕物から核酸を分離する方法に関する。具体的には、本発明は、正味の電荷が正である物質から核酸を分離するために低いpHにおいて電気泳動を使用することに関する。

【0002】

【従来の技術】ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような非常に巧妙な増幅技術の開発をはじめとし、微量の核酸を検出する技術がこの20年間で急速に進歩してきた。研究者らは、このような技術の価値が、人や動物の被験体において疾患や遺伝的特徴を検出することにあることを容易に認識している。

【0003】PCRは、当該技術分野における顕著な進歩であって、極微量の目的核酸の検出を可能ならしめるものである。PCRの詳細については、例えば、米国特許第4,683,195号(Mullisら)、同第4,683,202号(Mullisら)及び同第4,965,188号(Mullisら)に記載されているが、この分野の文献数は急速に増加しつつある。詳細には説明しないが、PCRには、重合剤(例えば、DNAポリメラーゼ)とデオキシリボスクレオトリホスフェートの存在下、目的とする核酸の鎖(「鋳型」とみなされる)にプライマーを適当な条件下でハイブリダイズさせる工程が含まれる。その結果、鋳型に相補的なヌクレオチドが鋳型に沿って付加されたプライマー伸長生成物が形成される。

【0004】このプライマー伸長生成物を変性すると、

鋳型の複製物が一つ調製されたことになり、このブラーミング、伸長及び変性のサイクルを所望の回数実施することにより、目的核酸と同一の配列を有する核酸の量を対数増加させることができる。実際に、目的の核酸を、その検出が一層容易となるように何回も複製(又は増幅)する。

【0005】目的の核酸を効果的に増幅し検出するためには、或いは、目的の核酸をクローニング又は配列決定するためには、その核酸を他の妨害となる生体分子の混合物から単離又は分離しなければならないことが多い。

(Moore D., 1977, Preparation and Analysis of DNA. Unit 2.2 In Ausubel et al. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York).

【0006】現在のところ、核酸複製物からタンパク質その他の不純物を取り除くために数種類の手段が用いられている。伝統的には、生物学的試料をプロテアーゼで消化し、不純物を有機抽出法により核酸から除去する(Moore D., Current Protocols in Molecular Biology)。しかしながら、この方法には、有害な有機溶媒を使用することや、水相を新しいチューブへ何回も移す必要があるため迅速で、労働集約的であり、しかも試料の交雑汚染の危険性が増す、等の多くの欠点があることが認識されている。

【0007】最近では、カオトロピック塩においてガラスに吸着させる方法による核酸の精製法が普及してきた(Boom et al., 1990, J. Clinical Microbiol. 28: 495-503)。しかしながら、この分離法も、バインディング容量の非常に小さいガラスを使用すること、カオトロピック塩を使用すること、そしてガラス/核酸複合体を何度も洗浄し、その洗浄液を除去しなければならないために退屈時間が長いかかること、といった多くの欠点に悩まされる。

【0008】DNA精製のためのポリマー捕捉法であるイオン交換法を使用して核酸を単離することも行われている(米国特許第5,582,988号、同第5,434,270号及び同第5,523,368号)。残念ながら、この方法は、RNAが捕捉、解放のどちらの際にも分解するため、特に現在実施されている条件下でRNAを精製する場合には適さない。ポリマー/核酸の最適な捕捉条件下ではリボスクレアーゼが高いためにRNAの分解をもたらし、また核酸をポリマーから解放するのに必要な高いpHが化学的加水分解をもたらす。

【0009】電気泳動による分離法は、有害な物質、高いpH及び退屈な操作を回避するように設計できたため、魅力的な技法である。さらに、電気泳動による分離

法は自動化されたフォーマットに適合しやすい。電気泳動法はほとんどが分析的規模で採用されているが、小規模の調製手順もまた数多く開発されている (Andrews, A. T., 1986, Electrophoresis: Theory and Techniques, and Biochemical and Clinical Applications, 2nd edition, Clarendon Press, Oxford, England)。ポリビニルピロリドン/アガロースゲル上での電気泳動により腐植物質その他のPCRを阻害する不純物からDNAを分離する方法も報告されている (Herrick et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59: 687-694 及び Young et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59: 1972-1974)。さらに、Sheldon とその共同研究者は、核酸の電気泳動による精製のための装置を開発した。細胞又は血液試料をプロテアーゼで溶解し、その溶解物を当該装置に装填する。核酸は、ポリマー層中の電気泳動により不純物から分離され且つ、分子量で仕切る膜によりコレクションチャンパーに保持される一方、分解されたタンパク質その他低分子量物質は当該膜を通過する (Sheldon E. L., 1997, Electronic Sample Handling, International Business Preparation Workshopにて発表, San Diego, CA., June 9, 1997)。

【0010】電気泳動による分離法は、上記の例をはじめとし、ほとんどが中性に近いpHで行われているが、低いpHでの電気泳動が有利な場合もある。例えば、巨大分子の中には低いpHの方が分離効率が高くなるものがある。ヌクレオチド又は低分子量ポリヌクレオチドの混合物は低いpHの方が分離性が良くなる。これは、ヌクレオチドの電荷が、 $pH=2\sim5$ の範囲では $-1\sim0$ の変動を示すが、 $pH=6\sim8$ の範囲ではほとんどが同一の電荷 (-2) を示すからである (Smith, J. D., 1976, Methods Enzymol. 12: 350-361)。同様に、等電点電気泳動法では、酸性タンパク質がpH勾配中のpKaにおいて分離される (Andrews, A. T., 1986)。さらに、低いpHの方が安定性が高くなる構造もある。TerwillingerとClarkeは、酸性条件 ($pH=2.5$) が電気泳動時のタンパク質メチルエステルの加水分解を最小限に抑えるのに役立つことを報告している (Terwillinger et al., 1981, J. Biol. Chem. 256: 3067-75)。同様に、温和な酸性条件 ($pH=4.5$) でB-DNAのトリプルヘリックス構造が安定化される (Minkin et al., 1987, J. Biol. C

hem. 234: 1512-16)。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】したがって、核酸、特に血液や血漿のようなタンパク質の豊富な源に由来する核酸を調製するための電気泳動に低いpH条件を採用できれば望ましく且つ有利であろう。遍在し且つ電気泳動中に核酸を分解するヌクレアーゼ、特にリボヌクレアーゼは、低いpHにおいて不活性化される (Kalmitsky et al., 1959, J. Biol. Chem. 234: 1512-16)。その上、ほとんどの核酸とタンパク質は、酸性条件下では反対の電荷を有するため、電界の中で逆方向に移動する。 $pH=2$ において、第一ホスフェート基のpKaは2未満であるがアミン基のpKaは2～5の範囲にあるため、核酸はなお負に帯電する (Smith, J. D., 1976)。他方、ほとんどのタンパク質は、そのすべてのアミン基及び大部分のカルボキシル基のpKaが2よりもはるかに高いため、完全にプロトン化し、よって正に帯電する。

【0012】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明は上記課題を解決すべく、低いpHにおいて正味の電荷が正である物質から酸性条件下での電気泳動により核酸を分離するのに必要な手段を提供する。低いpHにおける電気泳動は、核酸精製のための現行法にまつ問題の多くを解決することにもなる。上述のように、低いpHではヌクレアーゼ活性が低くなるため、核酸は中性pHにおけるよりも安定性が高くなる。その上、試料を装填してしまえば、電気泳動は手がからない方法である。最後に、有害な材料を必要とすることもまったくない。本発明の様々な目的、利点については本発明の詳細な説明で明らかとなる。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明は、核酸をその他の細胞破砕物、特に低いpHにおいて正味の電荷が正である物質から、酸性条件下での電気泳動により分離するための方法に関する。本発明の精製法では、試料を電気泳動ゲルにアプライしその試料を酸性条件下で電気泳動させることにより、核酸が同一の生物学的試料中のタンパク質から分離される。至適pHは、試料の種類によって異なる可能性があるが、当業者であれば容易に求めることができる。当該分離を約2～約4のpH範囲で行うことが好ましい。より好ましくは、電気泳動を $pH=2.5$ で実施する。

【0014】約2～4のpH範囲では、ホスフェート基のpKaが低いためにほとんどの核酸は正味の電荷が負となるが、ほとんどのタンパク質は、その官能基 (アミノ基及びカルボキシル基) がはるかに高いpKaを有するために、正味の電荷が正となる。その結果、ほとんどの核酸とタンパク質は、約2～4のpH範囲での電気泳動に際して反対方向に移動する。この方法は、核酸を調

製するための現行の電気泳動法、すなわち核酸とタンパク質とが同一方向（アノード方向）に移動するようなpHにおいて実施される方法は相違する。分子が反対方向に移動すると、分離は完全性、効率共に一層高くなる。

【0016】試料のpHは、pHシフトによりRNAase活性を迅速且つ効率的に阻害する必要があるため、試料をゲルにアプライする前に調整すべきである。本発明において酸性pHを達成するために使用するために適した試薬として、HCl、グリシン-HCl、硫酸又はリン酸、その他のホスフェート、フタレート、フマレート、タルトレート、シトレート、グリシルグリシン、フロエート又はホルメートのような緩衝剤が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0016】本発明を実施するために各種の装置及びフォーマットを使用することができる。後述の実施例ではGeneCAPSULE（商標）を使用するが、その他の予め組み立てられた直接注入装置でも好適である。その上、目的の分子を、均質マトリックス中の電気泳動で得られるよりも不純物からきれいに分離するために、調製用の等電点電気泳動法、特にpH勾配を固定した方式を使用することができる（Righetti及びWenisch, 1997, Preparative Isoelectric Focusing Using Immobilized Membranes: Theory and History. IsoPrime Application Note; No. 1 Hoefer Scientific Instrument s）。

【0017】本発明の分離法により、有害材料、退屈な移し替え又は抽出が無いなど、従来の核酸精製法よりも有利な点が数多く得られる。さらに、中性付近のpHの代わりに酸性条件下（pH≦3）で電気泳動を行うので、スクレーパーは実質的に不適性であり、RNAの化学的安定性が高くなる。その上、pH=2.5のような酸性条件下では、核酸とほとんどのタンパク質とは反対の電極に向かって移動するので、分離の効率、完全性共に高くなる。

【0018】核酸が、生物学的試料中に存在するタンパク質から分離されたら、境界を取り除き、そして分離された核酸を当該技術分野で周知の技法によりゲルから取り出すことができる。その後、このように精製された核酸は、PCRやリガーゼ連鎖反応等の標準的な増幅法及び/又は検出法に用いるのに適したものとされる。

【0019】PCRによる核酸の増幅、検出のための一般原理及び条件については周知であり、その詳細については米国特許第4,683,195号（Mullisら）、同第4,683,202号（Mullisら）及び同第4,965,188号（Mullisら）をばじめとする多数の文献に記載されており、本明細書ではこ

れらを参照することにより明細書の一部とする。このように、当該技術分野の教示及びその中の具体的な教示に照らして、当業者であれば、増幅アッセイにおいて完全なRNAもしくはDNAの回収効率が低いことによるか又は増幅インヒビターの存在による偽陰性の結果を排除するために本発明を実施することに何ら困難を伴うことはないはずである。用語「生物学的試料」には、細胞材料、ウイルス材料、毛髪、体液又は検出できる核酸を含む細胞材料が包含されるが、これらに限定はされない。

【0020】本明細書に記載した方法を用いて、感染疾患、遺伝病もしくは細胞病、例えばガン、又はその他のこれらのカテゴリーに具体的に含まれない何らかの疾患状態に関連する特異的な核酸配列を検出することができる。また、法医学的調査やDNAタイピングにも使用することができる。本発明の目的に關し、遺伝病にはすべての生物に由来するゲノムDNAの特異的欠失又は変異、例えば、鎌状赤血球貧血、囊性線維症、α-地中海貧血、β-地中海貧血その他当業者に自明なものが包含される。ヒト白血球抗原（HLA）を本発明で分類することができる。検出可能なバクテリアとして、血液中に存在し得るバクテリア、サルモネラ、連鎖球菌種、クラミジア種、淋菌種、マイコバクテリア種（例、ヒト結核菌及び鳥結核菌の複合体）、マイコプラズマ種（例、インフルエンザ菌及び肺炎マイコプラズマ）、レジェネラ・ニューモフィラ菌、ボレリア症（*Borrelia burgdorferi*）、ニューモシステス・カリニ、クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）、キャンピロバクター種、エルギニア種、赤痢菌種及びリステリア種が挙げられるが、これらに限定はされない。検出可能なウイルスとして、単純性疱疹ウイルス、エプスタインバーウイルス、呼吸性合胞体ウイルス、肝炎ウイルス及びレトロウイルス、合胞体ウイルス、肝炎ウイルス及びレトロウイルス（例、HTLV-I、HTLV-II、HIV-I及びHIV-II）が挙げられるが、これらに限定はされない。さらに、原生動物寄生虫及び菌類（酵母やカビを含む）も検出可能である。その他の検出可能な種については当業者であれば自明である。本発明は、各種バクテリア又はウイルスに関連するRNAの有無を検出する場合に特に有用である。

【0021】

【実施例】材料

塩酸はBaker社の試薬級とした。グリシン（分子生物学級）、子牛胸腺DNA、E. Coli由来の5S rRNA及びE. Coli由来の16S+23S rRNAはSigma Chemical社（St. Louis, MO）のものとした。pTRI-XefI転写体は、製造業者の指示に従いインビトロ転写系でAmbionのMegascriptを含むAmbion社（Austin, TX）のpTRI-XefIプラスミドか

ら合成した。アガロースは、FMC Bioproducts (Rockland, ME) の SeaKem LE とした。Gene Technology 社 (St. Louis, MO) の GeneCAPSULE (商標) 電気泳動装置を使用し、製造業者の指示を下記実施例 2 に記載したように変更することにより、RNA をタンパク質から分離した。タンパク質の水準については、Pierce 社 (Rockford, IL) の BCA タンパク質アッセイ用試薬キットを製造業者の指示に従い使用して測定した。

【0022】実施例 1

酸性条件下での電気泳動に際して核酸がアノードの方向へ移動することを確かめるため、1% アガロースゲルを調製し、どちらも pH=2.5 の 3 mM の HCl 又は 50 mM のグリシン-HCl において実験した。牛牛胸腺 DNA (図 1 中第 1 レーン)、1.9 kb mRNA (pTRI-Xef1 転写体; 第 2 レーン)、E. Coli 由来の 16S+23S rRNA (第 3 レーン) 及び E. Coli 由来の 5S rRNA (第 4 レーン) の試料各 0.5 µg を、上記ゲルのカソード端におけるウェルに添加し、100 V を 15 分間印加した。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そして UV 透視により撮影した。図 1 に示したように、pH=2.5 の HCl (パネル A) 又はグリシン-HCl (パネル B) において DNA 及び三種類の RNA のいずれもカソードから離れてアノードの方向に移動した。したがって、これらの核酸は pH=2.5 において正味の負電荷を維持している。

【0023】実施例 2

酸性条件下での電気泳動に際して核酸とタンパク質が反対方向に移動することを例証するため、変更した GeneCAPSULE (商標) 装置 (図 2) において rRNA を血漿タンパク質から分離した。これらの装置は、アガロース又はポリアクリルアミドのゲル片から電気泳動により DNA、RNA 又はタンパク質を分離するように設計した。製造業者の所期の使用法に従い、目的の核酸又はタンパク質のバンドを含むゲル片をピックアップして Gel PICK (商標) に入れ、その後その Gel PICK (商標) をアガロースゲルで満たし、Gene TRAP (商標) を組み合わせた。Gene TRAP (商標) の一端には、電子は通過させるが巨大分子は捕捉するような膜 (おそらくは透析膜) がある。組み合わせた GeneCAPSULE (商標) を電気泳動用緩衝液に浸し、トラップをアノードの方向に向け、そして膜に隣接するトラップ中の残留緩衝液 (25~40 µM) の中へ電気泳動により核酸又はタンパク質を溶解した。

【0024】本実験の目的のため、血漿と rRNA の混合物を Gel PICK (商標) 中のアガロースにおいて流延し、そして Gel PICK (商標) の両端に G

ene TRAP (商標) を組み合わせでどちらかの方向に移動する巨大分子を捕捉した。これを達成するため、Gel PICK (商標) の一端をパラフィンでふさいだ。アガロースを 1.10 mM のグリシン-HCl (pH=2.5) に 2.2% で煮沸により溶解し、そしてアガロースが固化しないように 250 µL のアリコートに 50~60 °C に置いた。溶解したアガロースに、100 µL の血漿と、200 µL の 80 mM の HCl と、各 20 µg の E. Coli 由来の 5S、16S 及び 23S rRNA を添加して、pH=2.5 において 1% アガロース及び 50 mM のグリシン-HCl の最終濃度を得た。この混合物をボルテックス攪拌し、すぐに上記のふさいだ Gel PICK (商標) にビベットで入れた。両方のトラップに 100 µL の 50 mM のグリシン-HCl を添加し、そしてこれらをピックと組み合わせで気泡が駆逐されるように傾けて保持した。1% アガロース水溶液を使用してトラップをピックに封じた。組み合わせた GeneCAPSULE (商標) を水平型電気泳動チャンパーにおいて 50 mM のグリシン-HCl に浸し、そして 100 V を 1 時間印加した。製造業者の指示に従い、RNA を膜から解放するために、電流を逆にして 60 秒間流した。GeneCAPSULE (商標) を電気泳動用緩衝液から取り出し、製造業者の指示に従い、膜に隣接する残留緩衝液を両方のトラップから取り出した。予備実験において、残った RNA 及びタンパク質の一部が電流を逆にして 60 秒間流した後にも捕捉膜に吸着していたことが発見された。それゆえ、この膜をトラップから取り出し、100 µL の 50 mM のグリシン-HCl (pH=2.5) において 37 °C で 1 時間溶離した。また、アガロースゲルをトラップから取り出し、溶融し、そして残留する RNA とタンパク質についても分析した。各画分を、1×TBE (89 mM のトリス-ホウ酸塩、2 mM の EDTA) における標準の 1% アガロースゲル上で等比率で流すことによって、RNA の有無についてチェックした。さらに、各画分のアリコートをタンパク質含有量についてアッセイした。

【0025】表 1 に示したように、タンパク質は、アガロースゲル (第 4 列) において又は GeneCAPSULE (商標) のカソードもしくはは正極端において、トラップ中 (第 2 列) 又は膜上 (第 5 列) のいずれかにおいて検出された。アノード又は正極端においては、回収された全タンパク質の 5% しか認められなかった (第 3 列及び第 6 列)。一方、図 3 のアガロースゲル上に示したように、RNA は、トラップ中 (第 3 列) 又は膜上 (第 6 列) のいずれかにおいて、GeneCAPSULE (商標) のアノードもしくはは正極端においてのみ検出された。第 1 レーン的全 RNA との強度比較により求められるように、RNA の一部しか回収されなかった。RNA のパルスを、GeneCAPSULE (商標) の上又は正極膜上の左側に吸着したようである。しかしなが

ら、タンパク質が見つかったカソード端又は負極端においては何も検出されなかった（第2レーン及び第5レーン）。したがって、これらの核酸とタンパク質は、実際に $pH=2.5$ での電気泳動の際に反対方向に移動した。

【0026】本発明をその好適な具体的態様を特に参照しながら詳説したが、当業者であれば、本発明の精神、範囲内での変更、バリエーションが可能であることは理解される。本明細書中で参照した刊行物は、これらをすべて本明細書の一部とする。

【図面の簡単な説明】

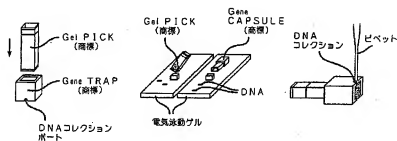
【図1】図1は、 $pH=2.5$ におけるアガロースゲル上での核酸の電気泳動の結果を示す図面代用写真である。1%のアガロースゲルを調製し、 $pH=2.5$ において、A. 3mMのHCl又はB. 50mMのグリシン-HClにおいて流した。第1レーン=子牛胸腺DN

A、第2レーン= $pTR1-Xef$ 転写体、第3レーン= $16S+23S$ rRNA、第4レーン= $5S$ rRNA。1レーン当たり核酸0.5 μ g。

【図2】図2は、核酸及びタンパク質をアガロースゲル及びアクリルアミドゲルから電気溶解するためのGeneCAPSULE（商標）の使用を示す。GenoTechnology（St. Louis, MO）の販促用文献から転載。

【図3】図3は、GeneCAPSULE（商標）における $pH=2.5$ での電気泳動後のrRNAの回収を示す図面代用写真である。実施例に記載したように、1%アガロースゲルを調製し、TBEにおいて流した。第1レーン=各1 μ gの23S、16S及び5SのrRNA、第2～6レーン=表1に列挙したように、GeneCAPSULE（商標）由来の等比率面分。

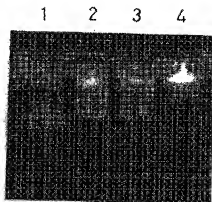
【図2】



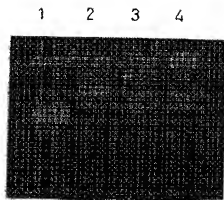
【図1】

図面代用写真

(A)



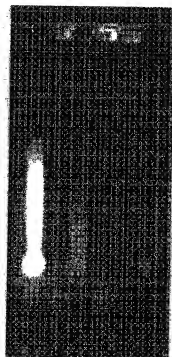
(B)



【図3】

図面代用写真

1 2 3 4 5 6



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

鑑別記号

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

P

// C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

Z

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 27/26

3 2 5 E

(72) 発明者 ジョン ウェズリー パッカス
アメリカ合衆国, ミズーリ 63021, ポー
ルウィン, キャリッジ ブリッジ トレイ
ルズ 1438

1. Title of Invention

Method of Separating Nucleic Acid

2. Claims

1. A method of separating nucleic acid from cellular debris in a sample comprising:
 - (a) applying the sample to an acid medium at low pH.
 - (b) subjecting the sample to an electric field means.
 - (c) separating the nucleic acids in the acid medium from the cellular debris.
2. The method according to claim 1 wherein the electrophoresis is carried out at a pH of about 2 to about 4.
3. The method of claim 1 wherein the cellular debris is a protein.
4. The method of claim 1 wherein the electric field means is electrophoresis.
5. The method of claim 1 wherein cellular debris has a net positive charge.
6. A method of purifying nucleic acids from a biological sample comprising:
 - (a) applying the sample to an acid medium at low pH.
 - (b) subjecting the sample to an electric field means.
 - (c) separating the nucleic acids in the medium from the cellular debris.

3. Detailed Description of Invention

Field of the Invention

The present invention relates generally to methods of separating nucleic acids from cellular debris, such as proteins, in a biological sample. Specifically, the invention relates to the use of electrophoresis at a low pH to separate nucleic acids from substances carrying a net positive charge.

Background Invention

Technology to detect minute quantities of nucleic acids has advanced rapidly over the last two decades including the development of highly sophisticated amplification techniques such as polymerase chain reaction (PCR). Researchers have readily recognized the value of such technologies to detect diseases and genetic features in human or animal test specimens.

PCR is a significant advance in the art to allow detection of very small concentrations of a targeted nucleic acid. The details of PCR are described, for example, in US-A-4,683,195 (Mullis et al), US-A-4,683,202 (Mullis) and US-A-4,965,188 (Mullis et al), although there is a rapidly expanding volume of literature in this field. Without going into extensive detail, PCR involves hybridizing primers to the strands of a targeted nucleic acid (considered "templates") in the presence of a polymerization agent (such as DNA polymerase) and deoxyribonucleoside triphosphates under the appropriate conditions. The result is the formation of primer extension products along the templates, the products

having added thereto nucleotides which are complementary to the templates.

Once the primer extension products are denatured, and one copy of the templates has been prepared, the cycle of priming, extending and denaturation can be carried out as many times as desired to provide an exponential increase in the amount of nucleic acid which has the same sequence as the target nucleic acid. In effect, the target nucleic acid is duplicated (or "amplified") many times so that it is more easily detected.

In order to effectively amplify and detect a target nucleic acid or to clone or sequence a target nucleic acid, it is frequently necessary to isolate or separate the nucleic acid from a mixture of other interfering biomolecules. (Moore D., 1997. Preparation and Analysis of DNA. Unit 2.2 In Ausubel et al. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.)

Presently, several different procedures are used to remove proteins and other impurities from nucleic acid preparations. Traditionally, biological samples were digested with a protease, and impurities removed from the nucleic acids by organic extraction (Moore D., Current Protocols in Molecular Biology). This method, however, has several recognized disadvantages including using hazardous organic solvents and requiring several transfers of aqueous phase to fresh tubes, which is tedious, labor intensive, and adds to the risk of cross contaminating samples.

Purification of nucleic acids by adsorption to glass in a chaotropic salt has become popular more recently

(Boom et al., 1990, J. Clinical Microbiol. 28:495-503). However, this separation method also suffers from several disadvantages including using glass that has a very low binding capacity, employing chaotropic salts, and being tedious and time consuming because the glass-nucleic acid complex must be washed several times and the wash solution removed.

Polymer capture, an ion exchange procedure, to purify DNA has also been employed to isolate nucleic acids (US Patent Nos. 5,582,988, 5,434,270, and 5,523,368). Unfortunately, such procedures are not particularly suitable for RNA purification under the conditions currently practiced because RNA would be degraded both during capture and release. Under optimal polymer-nucleic acid capture conditions ribonuclease activity would be high resulting in degradation of the RNA and the high pH needed to release nucleic acids from the polymer would result in chemical hydrolysis.

Electrophoretic separation is an appealing technique because such procedures can be designed to avoid hazardous substances, high pH, and tedious manipulations. In addition, electrophoretic separation is readily adaptable to automated formats. Although electrophoresis is most often used on an analytical scale, many small-scale preparative procedures have been developed as well (Andrews, A. T., 1986, Electrophoresis: Theory and Techniques, and Biochemical and Clinical Applications, 2nd edition. Clarendon Press, Oxford, England). Procedures have also been reported that separate DNA from humic materials and other impurities that inhibit PCR by electrophoresis on polyvinylpyrrolidone-agarose gels (Herrick et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59:687-

694 and Young et al., 1993, Appl. Environ Microbiol., 59:1972-1974). In addition, Sheldon and co-workers developed a device for electrophoretic purification of nucleic acids. Cells or blood samples are lysed with a protease and the lysate is loaded into the device. Nucleic acids are separated from impurities by electrophoresis through a polymer layer and are retained in a collection chamber by a molecular weight cut-off membrane, while degraded proteins and other low molecular weight substances pass through the membrane (Sheldon E. L., 1997, Electronic Sample Handling. Presented at International Business Preparation Workshop. San Diego, CA., June 9, 1997).

Although most electrophoretic separations are run at a pH close to neutral, including those examples mentioned above, electrophoresis at low pH is sometimes advantageous. For example, some macromolecules separate more efficiently at low pH. Mixtures of nucleotides or low molecular weight polynucleotides separate better at low pH because the charge on nucleotides varies from negative 1 to 0 between pH 2 and 5, while most have the same charge (minus 2) between pH 6 and 8 (Smith, J. D., 1976, Methods Enzymol. 12:350-361). Similarly, with isoelectric focusing, acidic proteins are isolated at their pKa in a pH gradient (Andrews, A. T., 1986). In addition, some structures are more stable at low pH. Terwillinger and Clarke reported that acidic conditions (pH 2.5) help minimize hydrolysis of protein methyl esters during electrophoresis (Terwillinger et al., 1981, J. Biol. Chem. 256:3067-75). Similarly, triple helix structures of B-DNA are stabilized by mild acid

conditions (pH 4.5) (Mirkin et al., 1987, J. Biol. Chem. 234:1512-16).

Accordingly, it would be desirable and advantageous to be able to use low pH conditions for preparative electrophoresis of nucleic acids, especially from protein-rich sources such as blood or plasma. Nucleases, especially ribonucleases, which are ubiquitous and will degrade nucleic acids during electrophoresis, are inactivated at low pH (Kalmitsky et al., 1959, J. Biol. Chem. 234:1512-16). Furthermore, most nucleic acids and proteins will have opposite charges under acid conditions, and therefore, will migrate in opposite directions in an electric field. At pH 2, nucleic acids will still be negatively charged, because the pKa values of the primary phosphate groups are less than 2 while those of the amine groups are between 2 and 5 (Smith, J. D., 1976). On the other hand, most proteins will be fully protonated, and therefore, positively charged because the pKa's for all the amine and most carboxyl groups of proteins are much greater than 2.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention overcomes the above-noted problems and provides a needed means for separating nucleic acids from substances that carry a net positive charge at low pH by electrophoresis under acid conditions. Electrophoresis at low pH also overcomes many of the problems with current methods for nucleic acid purification. As mentioned above, nucleases are less active at low pH, so the nucleic acids would be more stable than at neutral pH. Furthermore, once samples are

loaded, electrophoresis is a hands-off method. Finally, no hazardous materials are needed.

Various other objects and advantages of the present invention will be apparent from the detail description of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the results of electrophoresis of nucleic acids on agarose gels at pH 2.5. One percent agarose gels were prepared and run in: A. 3 mM HCl, or B. 50 mM glycine-HCl, pH 2.5. Lane 1, calf thymus DNA; lane 2, pTRI-Xef transcript; lane 3, 16S + 23S rRNA; lane 4, 5S rRNA; 0.5 ug nucleic acid per lane.

Figure 2 illustrates the use of GeneCAPSULE for electroelution of nucleic acids and proteins from agarose and acrylamide gels. Taken from GenoTechnology's (St. Louis, MO) promotional literature.

Figure 3 shows the recovery of rRNA after electrophoresis at pH 2.5 in GeneCAPSULE. A 1% agarose gel was prepared and run in TBE, as described in the Examples. Lane 1, 1 ug each of 23S, 16S and 5S rRNA; lanes 2-6 equal proportions of fractions from GeneCAPSULE, as listed in Table 1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for separating nucleic acids from other cellular debris, especially substances that carry a net positive charge at

low pH, by electrophoresis under acid conditions. In the purification method of the present invention, nucleic acids are separated from proteins found in the same biological sample by applying the sample to an electrophoresis gel and subjecting the sample to electrophoresis under acid conditions to separate the nucleic acids from the proteins. The optimum pH may differ for different sample types but can be readily determined by those skilled in the art. Preferably, the separation is performed at a pH of about 2 to about 4. More preferably, electrophoresis is carried out at a pH of 2.5.

At a pH between approximately 2 and 4, most nucleic acids will carry a net negative charge due to the low pK_a of phosphate groups, whereas most proteins will have a net positive charge because their functional groups (amino and carboxyl groups) have much higher pK_a 's. As a consequence, most nucleic acids and proteins will migrate in opposite directions during electrophoresis at a pH of about 2 to 4. This approach differs from current procedures for preparative electrophoresis of nucleic acids, which are run at a pH where nucleic acids and proteins migrate in the same direction (towards the anode). More complete and efficient separation should be achieved when molecules move in opposite directions.

Sample pH should be adjusted before applying the sample to the gel because pH shift needs to rapidly and efficiently inhibit RNA_{se} activity. Suitable reagents for use in the present invention to achieve an acid pH include, but are not limited to, HCl, glycine-HCl, sulfuric or phosphoric acids, and other buffers, such as

phosphate, phthalate, fumarate, tartrate, citrate, glycylglycine, furoate, or formate.

Various devices and formats can be used to practice the present invention. While the GeneCAPSULE™ is used in the following examples, other preassembled, direct injection devices would also be suitable. Furthermore, preparative isoelectric focusing, especially with immobilized pH gradients (Righetti and Wenisch, 1997, Preparative Isoelectric Focusing Using Immobilized Membranes: Theory and History. IsoPrime Application Note; No. 1 Hoefer Scientific Instruments.), could be used to give a clean separation of the molecules of interest from impurities than are obtained with electrophoresis through an homogenous matrix.

The separation method of the present invention offers several advantages over traditional methods for nucleic acid purification including an absence of hazardous materials, tedious transfers, or extractions. In addition, with electrophoresis under acid conditions ($\text{pH} \leq 3$) instead of at a pH close to neutral, nucleases are essentially inactive and RNA is chemically more stable. Moreover, under acid conditions, such as pH 2.5, nucleic acids and most proteins will migrate towards opposite electrodes for more efficient and complete separation.

Once the nucleic acids are separated from the proteins found in the biological sample, the electric field is removed and the separated nucleic acids can be removed from the gel using techniques well known in the art. Such purified nucleic acids are then suitable for

use in standard amplification and/or detection technologies, such as PCR and ligase chain reaction.

The general principles and conditions for amplification and detection of nucleic acids using PCR are quite well known, details of which are provided in numerous references, including U.S. Patent Nos. 4,683,195 (Mullis et al.), 4,683,202 (Mullis), and 4,965,188 (Mullis et al.), all of which are incorporated herein by reference. Thus, in view of the teachings in the art and the specific teachings provided herein, one skilled in the art should have no difficulty in practicing the present invention to eliminate false negative results which would be due to the presence of amplification inhibitors or due to inefficient recovery of intact RNA or DNA in amplification assays.

The term "biological sample" includes, but is not limited to, cellular or viral material, hair, body fluids or cellular material containing nucleic acids which can be detected.

The method described herein can be used to detect specific nucleic acid sequences associated with infectious diseases, genetic disorders or cellular disorders such as cancers or any other disease states not specifically included in these categories. It may also be used in forensic investigations and DNA typing. For purposes of this invention, genetic diseases include specific deletions or mutations in genomic DNA from any organism, such as sickle cell anemia, cystic fibrosis, α -thalassemia, β -thalassemia and others readily apparent to one skilled in the art. Human Leukocyte Antigen (HLA) can be categorized with the present invention. Bacteria

which can be detected include, but are not limited to, bacteria which may be found in the blood, *Salmonella*, *Streptococcus* species, *Chlamydia* species, *Gonococcus* species, mycobacteria species (such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex), *Mycoplasma* species (such as *Mycoplasma Haemophilus influenzae* and *Mycoplasma pneumoniae*), *Legionella pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, *Pneumocystis carinii*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter* species, *Yersinia* species, *Shigella* species and *Listeria* species. Viruses which are detectable include, but are not limited to, herpes simplex viruses, Epstein Barr virus, respiratory syncytial viruses, hepatitis viruses and retroviruses syncytial viruses, hepatitis viruses and retroviruses (such as HTLV-I, HTLV-II, HIV-I and HIV-II). Protozoan parasites and fungi (including yeasts and molds) are also detectable. Other detectable species would be readily apparent to one skilled in the art. The invention is particularly useful for the detection of the presence of RNA associated with various bacteria or viruses.

EXAMPLES

Materials:

Hydrochloric acid was reagent grade from Baker. Glycine (molecular biology grade), calf thymus DNA, 5 S rRNA from *E. Coli*, and 16 S + 23 S rRNA from *E. Coli* were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The pTRI-Xef1 transcript was synthesized from Ambion's (Austin, TX) pTRI-Xef1 plasmid with Ambion's Megascript in vitro transcription system according to the manufacturer's instructions. Agarose was SeaKem LE from FMC Bioproducts (Rockland, ME). The GeneCAPSULE™ electroelution device, from GenoTechnology (St. Louis, MO), was used to separate RNA from protein by modifying the manufacturer's instructions, as described in Example 2 below. Protein levels were determined with Pierce's (Rockford, IL) BCA Protein Assay Reagent kit according to the manufacturer's instructions.

Example 1:

To verify that nucleic acids will migrate towards the anode during electrophoresis under acid conditions, 1% agarose gels were prepared and run in either 3 mM HCl or 50 mM glycine-HCl, both at pH 2.5. Half microgram samples of calf thymus DNA (Fig. 1, lane 1), a 1.9 kb mRNA (pTRI-Xef1 transcript; lane 2), 16 S + 23 S rRNAs from *E. Coli* (lane 3), and 5 S rRNA from *E. Coli* (lane 4) were loaded into wells at the cathode ends of the gels, and subjected to 100 V for 15 min. The gels were stained with ethidium bromide, and photographed with UV transillumination.

As shown in figure 1, both the DNA and the three RNAs moved away from the cathode and towards the anode in either HCl (panel A) or glycine-HCl (panel B) at pH 2.5. Therefore, these nucleic acids maintain a net negative charge at pH 2.5.

Example 2:

To demonstrate that nucleic acids and proteins migrate in opposite directions during electrophoresis under acid conditions, rRNA was separated from blood plasma proteins in a modified GeneCAPSULE™ device (figure 2). These devices were designed to elute DNA, RNA, or proteins from agarose or polyacrylamide gel slices by electrophoresis. According to the manufacturer's intended use, a piece of gel containing a nucleic acid or protein band of interest is picked up into the Gel PICK™, then the Gel PICK™ is filled with agarose gel and assembled with a Gene TRAP™. The Gene TRAP™ has a membrane (probably dialysis membrane) at one end that lets electrons through, but traps the macromolecules. The assembled GeneCAPSULE™ is submerged in electrophoresis buffer with the trap towards the anode, and the nucleic acid or protein is eluted by electrophoresis into residual buffer (25-40 µl) in the trap next to the membrane.

For the purposes of this experiment, a mixture of blood plasma and rRNAs were cast in agarose in the Gel PICK™, and the Gel PICK™ was assembled with a Gene TRAP™ at both ends to capture macromolecules that migrate either direction. To accomplish this, one end of a Gel

PICK™ was plugged with parafilm. Agarose was dissolved in 110 mM glycine-HCl, pH 2.5, at 2.2% by boiling, and 250 µl aliquots were placed at 50-60 C to prevent the agarose from hardening. To the molten agarose were added 100 µl of blood plasma, 200 µl of 80 mM HCl, and 20 µg each of 5 S, 16 S, and 23 S rRNA from *E. Coli*, which yields final concentrations of 1% agarose and 50 mM glycine-HCl at pH 2.5. The mixture was vortexed and immediately pipetted into the plugged Gel PICK™. One hundred µl of 50 mM glycine-HCl was added to both traps, and these were assembled with the pick while held at an angle to expel bubbles. One percent agarose in water was used to seal the traps to the pick. The assembled GeneCAPSULE™ was submerged in 50 mM glycine-HCl in a horizontal electrophoresis chamber, and subjected to 100 V for 1 hr. The current was reversed for 60 sec, as recommended by the manufacturer to release RNA from the membrane. The GeneCAPSULE™ was removed from the electrophoresis buffer, and residual buffer next to the membrane was removed from both traps according to the manufacturer's instructions. In a preliminary experiment, it was discovered that some of the RNA and protein remained adsorbed to the trap membranes even after the current was reversed for 60 sec. Therefore, the membranes were removed from the traps and eluted in 100 µl of 50 mM glycine-HCl, pH 2.5 for 1 hr at 37 C. Also, the agarose gel was removed from the trap, melted, and analyzed for residual RNA and protein as well. Each fraction was checked for the presence of RNA by running equal proportions on a standard 1% agarose gel in 1 x TBE

(89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA). In addition, aliquots of each fraction were assayed for protein content.

As shown in Table 1, protein was detected in the agarose gel (row 4) or at the cathode, or negative end of the GeneCAPSULE™, either in the trap (row 2) or on the membrane (row 5). Only 5% of the total protein recovered was found at the anode, or positive end (rows 3 & 6). On the other hand, as shown on the agarose gel in figure 3, RNA was detected only at the anode, or positive end of the GeneCAPSULE™, either in the trap (lane 3) or on the membrane (lane 6). Only a portion of the RNA was recovered, as determined by comparing intensities with total RNA in lane 1. It is likely that the bulk of the RNA was adsorbed onto the GeneCAPSULE™ or left on the positive membrane. However, none was detected at the cathode, or negative end where the protein was found (lanes 2 & 5). Therefore, these nucleic acids and proteins did indeed migrate in opposite directions during electrophoresis at pH 2.5.

* * * * *

The present invention has been described in detail with particular reference to preferred embodiments thereof, but it will be understood by those skilled in the art that variations and modifications can be effected within the spirit and scope of the invention.

All publications mentioned hereinabove are hereby incorporated by reference.

~~loaded, electrophoresis is a hands-off method. Finally,~~
~~no hazardous materials are needed.~~

~~Various other objects and advantages of the present
invention will be apparent from the detail description of
the invention.~~

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the results of electrophoresis of nucleic acids on agarose gels at pH 2.5. One percent agarose gels were prepared and run in: A. 3 mM HCl, or B. 50 mM glycine-HCl, pH 2.5. Lane 1, calf thymus DNA; lane 2, pTRI-Xef transcript; lane 3, 16S + 23S rRNA; lane 4, 5S rRNA; 0.5 ug nucleic acid per lane.

Figure 2 illustrates the use of GeneCAPSULE for electroelution of nucleic acids and proteins from agarose and acrylamide gels. Taken from Genotechnology's (St. Louis, MO) promotional literature.

Figure 3 shows the recovery of rRNA after electrophoresis at pH 2.5 in GeneCAPSULE. A 1% agarose gel was prepared and run in TBE, as described in the Examples. Lane 1, 1 ug each of 23S, 16S and 5S rRNA; lanes 2-6 equal proportions of fractions from GeneCAPSULE, as listed in Table 1.

图面代用写真

FIG. 1

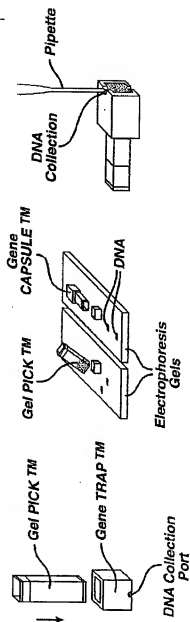
A 1 2 3 4



B 1 2 3 4



FIG. 2



図面代用写真

FIG. 3

1 2 3 4 5 6



1. Abstract

The present invention relates to methods for separating nucleic acids from other cellular debris, especially substances that carry a net positive charge at low pH, by electrophoresis under acid conditions. In the purification method of the present invention, nucleic acids are separated from proteins found in the same biological sample by applying the sample to an electrophoresis gel and subjecting the sample to electrophoresis under acid conditions to separate the nucleic acids from the proteins. The optimum pH may differ for different sample types but can be readily determined by those skilled in the art. Preferably, the separation is performed at a pH of about 2 to about 4. More preferably, electrophoresis is carried out at a pH of 2.5

2. Representative Drawing

Fig. 2